文章编号:1000-5404(2010)22-2361-04

论著

颈交感干离断对大鼠脑缺血再灌注损伤内质网应激相关因子的影响

赵 鹏[1,2],史 忠[1],周 坤[1],苑爱军[2],聂 鑫[2] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院急救部[1];130051 长春,解放军65316部队医院普外科[2])

【摘要】 **目的** 采用颈交感干离断(transection of cervical sympathetic trunk, TCST)方法模拟星状神经节阻滞(stellate ganglion block,SGB),观察其对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠皮质区神经元凋亡以及内质网应激相关因子GRP78和CHOP表达的影响。**方法** 健康雄性SD大鼠150只,按随机数字表法分成3组:假手术组(sham组)、再灌注模型组(I/R组)、治疗组(T组),每组50只。用线栓法行大脑中动脉栓塞(MCAO)建立大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型。治疗组行大脑中动脉栓塞后立即行TCST。应用免疫组化及实时荧光定量PCR方法检测脑缺血再灌注后不同时间点缺血周围区GRP78和CHOP的表达;TUNEL法检测细胞凋亡。**结果** I/R组和T组皮质区神经元凋亡指数较sham组显著增高($P<0.01$);与I/R组相比,T组再灌注12、24、48、72 h凋亡指数明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。I/R组和T组GRP78、CHOP mRNA和蛋白表达较sham组明显上调($P<0.01$);与I/R组相比,除72 h外,T组6、12、24、48 h GRP78、CHOP mRNA和蛋白的表达量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),但仍高于sham组($P<0.05$)。**结论** TCST对大鼠局灶性脑缺血损伤具有保护作用,其作用机制可能与改善内质网应激状态、降低内质网应激相关凋亡途径,从而发挥抗凋亡作用有关。

【关键词】 大脑中动脉栓塞;颈交感干离断;星状神经节阻滞;内质网应激;凋亡
【中图法分类号】 R741.02;R741.05;R743.31 【文献标志码】 A

Effects of transection of cervical sympathetic trunk on endoplasmic reticulum stress related factors in rats after focal cerebral ischemia reperfusion injury

Zhao Peng[1,2], Shi Zhong[1], Zhou Kun[1], Yuan Aijun[2], Nie Xin[2] ([1]Department of Emergency, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of General Surgery, Hospital of No. 65316 Troop, Changchun, Jilin Province, 130051, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effects of transection of cervical sympathetic trunk (TCST) on neuronal apoptosis and the expressions of endoplasmic reticulum stress (ERS) related factors GRP78 and CHOP after focal cerebral ischemia reperfusion injury by simulating stellate ganglion block. **Methods** One hundred and fifty male SD rats were randomly divided into 3 groups ($n=50$): sham operation, reperfusion model and treatment groups. The models of focal brain ischemia-reperfusion injury was established by occlusion of right middle cerebral artery. The rats in treatment group were performed by TCST after middle cerebral artery occlusion (MCAO). The expressions of GRP78 and CHOP in the ischemic penumbra tissue was detected by real-time PCR and immunohistochemistry at different time points, 12, 24, 48 and 72 h after 2 hours' ishemia. Apoptosis was detected by terminal-deoxynucleoitidyl transferase mediated dutp nick end labeling (TUNEL). **Results** Compared with the sham group, the index of apoptotic neuron was increased significantly in model group and treatment group ($P<0.01$), and compared with model group, the index of apoptotic neuron was significantly lower in treatment group ($P<0.05$). Compared with the sham group, the expressions of GRP78 and CHOP were increased significantly in model group and treatment group ($P<0.01$), and compared with model group, the index of apoptotic neuron was significantly lower in treatment group ($P<0.05$, $P<0.01$) at different time points 6, 12, 24, 48 h except 72 h after 2 hours' ischemia. **Conclusion** TCST has the protective effects against cerebral damage induced by focal ischemia reperfusion in rats, which may be related to inhibiting the process of the neuronal apoptosis. The mechanism of anti-apoptotic effect of TCST may be related to ERS and inhibit the ERS apoptosis pathway.

【**Key words**】 middle cerebral artery occlusion; transection of cervical sympathetic trunk; stellate ganglion block; endoplasmic reticulumstress; apoptosis

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2005CB522605). Corresponding author: Shi Zhong, Tel: 86-23-68755663, E-mail: xinqiaosz1106@sina.com

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(973计划,2005CB522605)
【通信作者】 史 忠,电话:(023)68755663,E-mail:xinqiaosz1106@sina.com

脑缺血再灌注(ischemia/reperfusion,I/R)损伤是各种急症危重症中常见的一种病理过程,其中神经元凋亡是关键环节。近年来,在I/R损伤康复治疗中应用星状神经节阻滞(stellate ganglion block,SGB)发挥了明显的脑保护作用,临床疗效明确,逐渐受到重视,但其抑制脑损伤所致神经元凋亡的具体机制尚未阐明。研究表明,在I/R损伤过程中伴随着内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)反应的发生,并提示ERS相关的细胞凋亡途径可能是I/R损伤所致神经元凋亡的重要调控环节[1,2]。本研究建立大鼠脑I/R损伤模型,并予以损伤后颈交感干离断(transection of cervical sympathetic trunk, TCST)干预,应用免疫组化和实时荧光定量PCR技术动态观察ERS以及细胞凋亡标志物变化情况,同时应用TUNEL法检测神经细胞凋亡,为进一步阐明SGB在脑缺血再灌注损伤后发挥脑保护作用的机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

健康雄性SD大鼠150只,10~12周龄,体质量(280±20)g,第三军医大学新桥医院实验动物中心提供。兔抗GRP78、CHOP多克隆抗体(博奥森公司),SABC免疫组化试剂盒(博士德公司),DAB显色试剂盒(中杉金桥公司),TUNEL检测试剂盒(罗氏公司),PCR引物(鼎安生物公司),RT试剂盒及荧光定量试剂盒(Tiangen Biotech公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验设计 采用随机数字表法分为再灌注模型组(I/R组)、治疗组(T组)和假手术组(sham组),每组50只,每组按再灌注时间不同再分为6、12、24、48 h和72 h 5个时相点,每个时相点10只大鼠。I/R组仅行MCAO,缺血2 h后拔出线栓;T组是在行大脑中动脉栓塞(MCAO)后立即行TCST;sham组仅完成I/R组相应的实验操作,插线深度仅为10 mm。每个时相点取5只动物常规灌注固定取脑,石蜡包埋切片,用于TUNEL检测和免疫组化。其余5只在各时相点断头,取右侧缺血半暗带区的顶叶皮质[3],用于Real-time PCR检测。

1.2.2 模型制备 I/R模型:直径0.26 mm的鱼线作栓子,采用Nagasawa改良线栓法制备大鼠MCAO模型。插入线栓深度由颈总动脉分叉处计[(18.5±0.5)mm],缺血2 h抽出鱼线,实施再灌注。TCST模型:在MCAO模型构建中,线栓插入成功后,于右侧颈总动脉分叉处的背侧面找到颈上神经节,距其下3 mm离断颈交感神经干,断端结扎。

1.2.3 大鼠神经行为学评分 参照Longa方法,根据大鼠肢体活动情况采用5级评分法对其神经功能缺损程度进行评定。评分1~3级者模型制备成功,余者剔除。不足预定数目按随机抽样原则补齐并重新建模。

1.2.4 TCST判定 清醒后,大鼠出现同侧眼睑下垂、眼裂变窄、瞳孔缩小等典型Horner综合征表现,即证明TCST成功。

1.2.5 免疫组化检测GRP78、CHOP蛋白表达水平 采用SABC法。常规设立阴性对照。切片常规脱蜡至水,3% H_2O_2处理后热修复抗原,5% BSA封闭,一抗(1∶100)4 ℃过夜,生物素化二抗37 ℃孵育30 min,加SABC,DAB显色。常规封片,镜下观察。每标本分别在顶叶皮层缺血周边区及sham组相应区域不重复随机选取5个高倍视野(×400)光镜下照相,运用图像分析软件Image Pro Plus 6.0测量阳性结果的平均光密度(mean density,MD),以表示GRP78、CHOP蛋白表达的相对强度。

1.2.6 TUNEL法测定神经元细胞凋亡 应用TUNEL法按照试剂盒说明书进行脑组织切片细胞凋亡的原位检测。用计算机图像分析仪(400倍视野),在顶叶皮层缺血周边区和sham组相应区域不重复随机选取5个阳性视野,计算出平均每个100个细胞中的凋亡细胞数,以百分数表示凋亡指数(apoptotic index,AI)。

1.2.7 RNA抽提和相对定量RT-PCR 用Trizol RNA提取试剂盒对标本提取总RNA,根据逆转录试剂盒说明书进行逆转录。在定量PCR仪(Bio-Rad C1000 Real-time PCR System)上进行PCR反应,反应所用的试剂盒为SYBR Green PCR Master Mix。PCR引物序列:β-actin正义链5′-AGATACTGCCCTGGCTCCTAG-3′,反义链5′-CATCGTACTCCTGCTTGCTGAT-3′,产物长度112 bp;GRP78正义链5′-ATCAGCCCACCGTAACAATCA-3′,反义链5′-TCCTGTCCCTTTGTCTTCAGC-3′,产物长度218 bp;CHOP正义链5′-GTGTACCCAGCACCATCACGC-3′,反义链5′-TCCTTTGGTCTACCCTCAGTC-3′,产物长度83 bp。退火温度60 ℃,循环34次。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 13.0统计软件,组间差异行单因素方差分析。

2 结果

2.1 各时间点皮质区GRP78和CHOP的表达

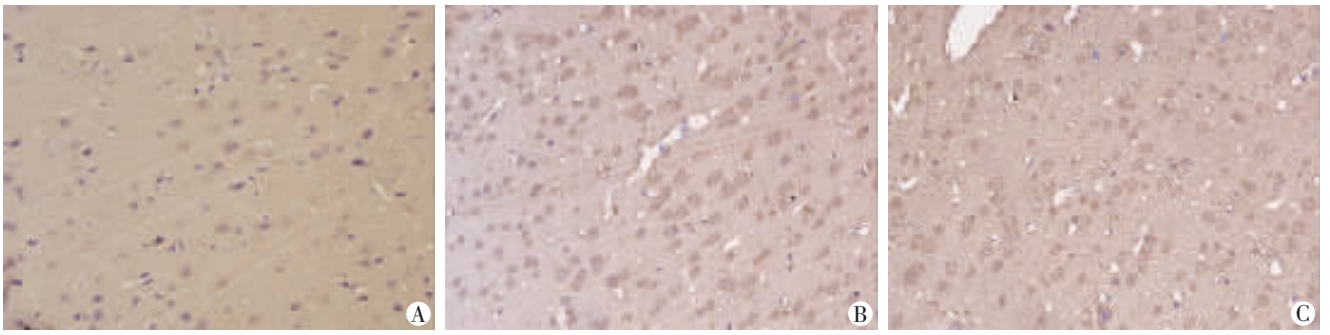
2.1.1 GRP78的表达 GRP78蛋白为细胞质着色,呈棕黄色颗粒,细胞核不着色。各组大鼠脑顶叶皮质区均存在一定数量的表达。I/R组及T组GRP78的MD值均比对应时间点sham组明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),I/R组随时间的延长,阳性细胞的MD值升高,12 h达高峰(图1),以后逐渐下降,72 h仍有表达。T组有类似动态变化。与I/R组相比,6、12、24、48 h T组表达降低($P<0.05$,$P<0.01$),72 h无统计学差异($P>0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠在各再灌注时间点GRP78表达的光密度值($n=5$,$\bar{x}\pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
sham组	0.077±0.018	0.083±0.017	0.072±0.016	0.072±0.021	0.070±0.008
I/R组	0.274±0.021^{b}	0.354±0.017^{b}	0.229±0.029^{b}	0.166±0.017^{b}	0.136±0.016^{b}
T组	0.222±0.027^{bc}	0.306±0.018^{bd}	0.165±0.024^{bc}	0.136±0.013^{bc}	0.108±0.018^{a}

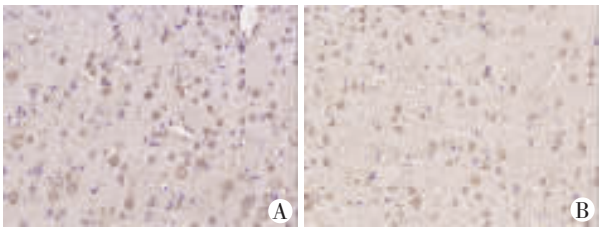
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与sham组比较;c:$P<0.05$, d:$P<0.01$,与I/R组比较

2.1.2 CHOP表达 CHOP蛋白为细胞核着色,呈棕黄色颗粒,细胞质可淡染。sham组顶叶皮层区未见阳性细胞表达。I/R组各时间点顶叶皮层区均可见CHOP蛋白表达,随着时间的延长,MD值逐渐增高,24 h达高峰,72 h仍可见表达。T组CHOP蛋白表达有类似动态变化(图2)。与I/R组相比,T组再灌注6、12、24、48 h表达降低($P<0.05$,$P<0.01$),72 h无统计学差异($P>0.05$)。见表2。



A :sham 组 ;B :I/R 组 ;C :T 组

图 1　缺血再灌注 12 h 大鼠大脑皮质区 GRP78 免疫阳性细胞形态学观察　(SABC ×400)



A :I/R 组 ;B :T 组

图 2　缺血再灌注 24 h 大鼠大脑皮质区 CHOP 免疫阳性细胞形态学观察　(SABC ×400)

表 2　各组大鼠在各再灌注时间点 CHOP 表达的光密度值
($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
I/R 组	0.206 ± 0.025	0.343 ± 0.017	0.490 ± 0.040	0.305 ± 0.015	0.131 ± 0.011
T 组	0.165 ± 0.020[a]	0.291 ± 0.018[a]	0.430 ± 0.558[b]	0.266 ± 0.012[a]	0.100 ± 0.027

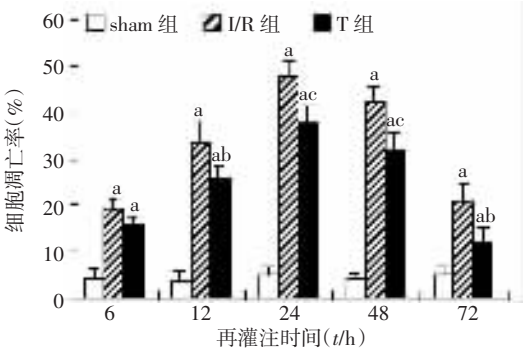
a :$P<0.05$, b :$P<0.01$, 与 I/R 组比较

2.2　TUNEL 检测结果

凋亡的细胞核呈棕黄色,染色不均,染色质浓集于核周。各时间点 sham 组仅见少量 TUNEL 阳性神经细胞。I/R 组各时间点梗死灶周围可见凋亡细胞,随时间延长,AI 逐渐增多,24 h 达高峰,再灌注 72 h 仍可见凋亡细胞,主要分布于梗死灶周围的缺血半暗带中,T 组有类似的动态变化(图 3)。I/R 组和 T 组皮质区 AI 较 sham 组均显著增高($P<0.01$);与 I/R 组相比,T 组再灌注 12、24、48、72 h 缺血侧顶叶 AI 减少($P<0.05$, $P<0.01$),6 h 无统计学差异($P>0.05$)。见图 4。

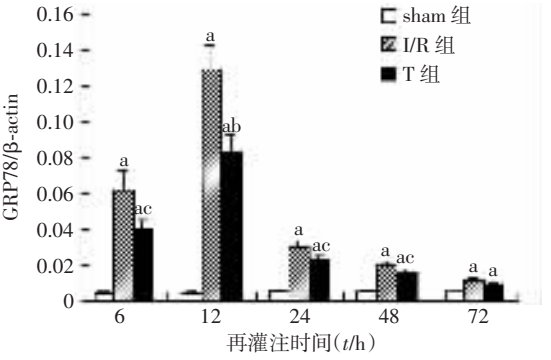
2.3　各时间点顶叶皮质区 GRP78 和 CHOP mRNA 的表达

与同一时间点 sham 组相比,I/R 组 GRP78 和 CHOP mRNA 表达量明显上调($P<0.05$),与 I/R 组相比,除 72 h 外,T 组 6、12、24、48 h GRP78 和 CHOP mRNA 的表达量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),但仍高于 sham 组($P<0.05$)。见图 5、6。



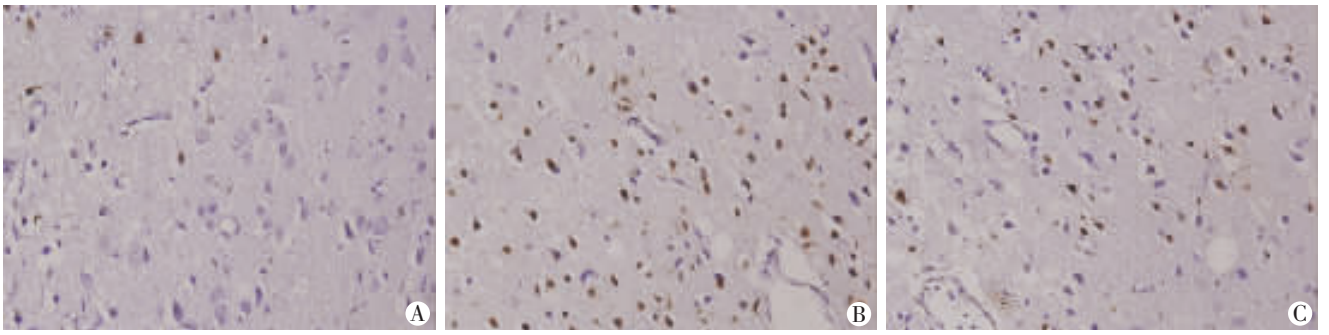
a :$P<0.01$, 与 sham 组比较 ;b :$P<0.05$, c :$P<0.01$, 与 I/R 组比较

图 4　各组缺血再灌注不同时间点神经元凋亡情况



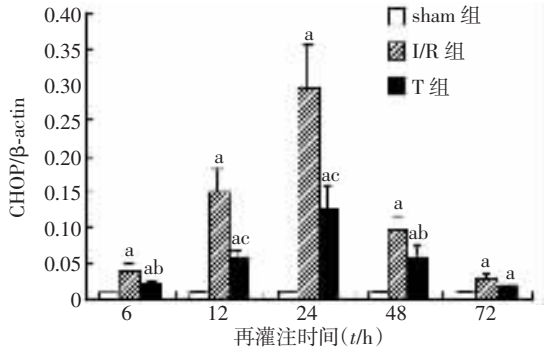
a :$P<0.05$, 与 sham 组比较 ;b :$P<0.05$, c :$P<0.01$, 与 I/R 组比较

图 5　各组脑缺血再灌注不同时间点 GRP78 mRNA 的表达



A :sham 组 ;B :I/R 组 ;C :T 组

图 3　缺血再灌注 24 h 大鼠大脑皮质区神经元凋亡改变　(TUNEL ×400)



a $P<0.05$，与 sham 组比较；b $P<0.05$，c $P<0.01$，与 I/R 组比较

图6 各组脑缺血再灌注不同时间段 CHOP mRNA 的表达

3 讨论

目前 SGB 技术在临床应用广泛，但主要应用于头、颈、胸和上肢的疼痛性疾病[4]，近来对脑 I/R 损伤神经元保护方面的作用也逐渐受到重视。临床观察发现其在各类脑外伤、脑缺血再灌注损伤的康复治疗中，也有较明确的临床疗效。动物实验表明其可降低脑组织梗死面积，抑制神经元凋亡[5]。但因 SGB 对机体产生的作用复杂多样，如降低交感神经的兴奋性、抑制 HPA 轴亢进等[6,7]，故其抑制神经元凋亡的机制很难明确。近期研究提示 ERS 反应参与细胞内多条重要信号级联反应偶联[8]，其在细胞质信号整合调节和细胞凋亡调控中的重要作用已引起人们的关注。内质网对应激极其敏感，应激状态下均可破坏内质网的稳态，出现错误折叠与未折叠蛋白在腔内聚集以及 Ca^{2+} 平衡紊乱的状态，称为内质网应激。为了减轻 ERS，真核细胞激活一系列自身保护机制，称为内质网应激反应[9]。GRP78 作为 ERS 标志物，其表达的增加提示 I/R出现了 ERS[10]。但严重和长时间的 ERS，会导致错误折叠蛋白继续累积增加，内质网功能不能修复，通过 PERK 活化、elf2α 磷酸化等途径诱导 caspase-12、CHOP 等活化，激活凋亡信号通路，最终导致细胞凋亡[11,12]。因此，SGB 对机体的多种作用效应可能通过后续的多条细胞质内信号途径，最终通过干预 ERS 环节发挥抗神经元凋亡和脑保护的作用。由于大鼠的 TCST 是模拟人类长期 SGB 较理想的动物模型[13]，本实验利用 TCST 方法，通过对大鼠脑 I/R 模型进行干预治疗，发现脑 I/R 损伤的确引起了 ERS 反应的发生。免疫组化和实时定量 PCR 结果表明，GRP78 在损伤早期表达即增高，12 h 达高峰，以后逐渐下降，72 h 仍有表达。这证实了 ERS 反应确实参与了 I/R 损伤的病理过程，与既往报道一致[14,15]。其次，TCST 干预后，大鼠脑损伤减轻，神经元凋亡数量明显降低。表现在与 I/R 组相比，T 组再灌注 12、24、48、72 h 缺血侧顶叶神经元 AI 减少，CHOP 表达也有明显下调，提示损伤早期 TCST 即开始发挥作用。再次，本研究发现在行 TCST 干预减轻脑损伤神经元凋亡的过程中，确实发生了 ERS 程度的降低，同 I/R 组相比，ERS 相关因子 GRP78 在同一时间点表达含量明显下调。最后，令人感兴趣的是，各组 ERS 标志性分子 GRP78 与凋亡相关分子 CHOP 变化趋势十分相似，均在损伤早期出现上调，区别在与 GRP78 早于 CHOP 在 12 h 达高峰后下降；而 CHOP 与 AI 的变化也有类似曲线，但高峰出现在 24 h。

综上所述，脑缺血再灌注启动 ERS 反应，而行 TCST 可减轻脑缺血再灌注损伤，此过程中伴有 ERS 反应程度降低，且内质网应激变化趋势与神经元凋亡变化趋势类似，提示干预内质网应激反应可能是 TCST 发挥脑保护抗神经元凋亡作用的重要机制，这为临床行 SGB 治疗脑缺血再灌注损伤的基础理论进一步提供依据。

参考文献：

[1] Nakka V P, Gusain A, Raghubir R. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats[J]. Neurotox Res, 2010, 17(2): 189-202.

[2] Lehotsky J, Urban P, Pavlikova M, *et al*. Molecular mechanisms leading to neuroprotection/ischemic tolerance: effect of preconditioning on the stress reaction of endoplasmic reticulum[J]. Cell Mol Neurobiol, 2009, 29(6/7): 917-925.

[3] Shi J, Yang S H, Stubley L, *et al*. Hypoperfusion induces overexpression of beta-amyloid precursor protein mRNA in a focal ischemic rodent model[J]. Brain Res, 2000, 853(1): 1-4.

[4] Ackerman W E, Zhang J M. Efficacy of stellate ganglion blockade for the management of type 1 complex regional pain syndrome[J]. South Med J, 2006, 99(10): 1084-1088.

[5] 熊良志，史永霞，王清秀，等. 颈交感神经干离断对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 实用医学杂志，2008，24(10)：1683-1686.

[6] 陆建华，粟永萍，陶军，等. 颈交感神经阻滞调节放烧复合伤小鼠巨噬细胞 GR 的表达及细胞因子分泌的影响[J]. 第三军医大学学报，2007，29(4)：284-286.

[7] 陆建华，陶军，叶建宁，等. 颈交感神经阻滞对放烧复合伤小鼠 HPA 轴的调节及相关机制研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(21)：2111-2114.

[8] Ferri K F, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(11): E255-E263.

[9] Schroder M. Endoplasmic reticulum stress responses[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(6): 862-894.

[10] Glembotski C C. Endoplasmic reticulum stress in the heart[J]. Circ Res, 2007, 101(10): 975-984.

[11] Rasheva V I, Domingos P M. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis [J]. Apoptosis, 2009, 14(8): 996-1007.

[12] Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(3): 363-373.

[13] Iwama H. Can superior cervical ganglionectomy be an experimental model of stellate ganglion block?[J]. Masui, 1997, 46(4): 565-567.

[14] Shibata M, Hattori H, Sasaki T, *et al*. Activation of caspase-12 by endoplasmic reticulum stress induced by transient middle cerebral artery occlusion in mice[J]. Neuroscience, 2003, 118(2): 491-499.

[15] 祝筱梅，刘秀华. 内质网应激与缺血再灌注损伤及其防护[J]. 国际病理科学与临床杂志，2006，26(2)：177-180，184.

（收稿 2010-07-05 修回 2010-07-19）

（编辑 龙 亮）